DOI:10.11931/guihaia.gxzw201812044

持续激活型 CIPK9 在花粉管生长过程中的生物学功能及亚细胞定位分析[1]

周利明，房玮*

（华北理工大学生命科学学院，河北 唐山 063210）

摘要：植物的花粉管生长是一个多因素参与的生理学过程，需要多种信号传导系统来引导植物细胞完成。钙离子作为第二信使，可以通过钙传感器 CBLs 激活下游的蛋白激酶 CIPKs 而参与调控细胞的极性发育过程。该研究中 CIPK9 被确定为候选基因，其 C 端与绿色荧光蛋白（GFP）相融合，通过基因枪技术在烟草花粉中进行瞬时表达，观察对应的亚细胞定位及花粉管中诱导的表型。结果显示 GFP 标记的 CIPK9 定位于花粉管中高速运动的颗粒状细胞器，并可随胞质环流进行规律的运动。为进一步探究 CIPK9 的生物学功能，该研究构建了持续激活型 CIPK9（CACIPK9）。与全长 CIPK9 相比较，CACIPK9 缺少 C 末端的调控区域，并在激酶区域的激活环中进行了点突变，从而表现出不受调控的持续高活性。实验结果显示缺少 C 端调控区的 CACIPK9 表现出非特异性的亚细胞定位，即与 GFP 对照相同的胞内弥散定位，说明 CIPK9 的 C 末端调控区对于其在花粉管中的正确定位发挥重要的调控作用。另外，CACIPK9 过表达可以引起花粉管的去极化生长表型。综上所述，CIPK9 作为钙信号下游家族的一员参与了花粉管极性生长的相关过程，并对花粉管的生长具有一定的调控作用。

关键词：花粉管，钙离子，CBL 互作蛋白激酶，极性生长，信号传导。

Subcellular localization and biological functional analysis of constitutively active CIPK9 in pollen tubes growth

ZHOU Liming, FANG Wei*

(*College of Life Sciences*, *North China University of Science and Technology*,

Tangshan 063210, Hebei, China)

Abstract: Pollen tube growth is a physiological process in which multi-factors are involved. The

---

基金项目：国家自然科学基金（31400168）；河北省自然科学基金（C2014209216, C2018209112）；国家重点实验室开放课题（SKLECRA2013OFP15）[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31400168); Natural Science Foundation of Hebei Province (C2014209216, C2018209112); Opening Foundation of National Laboratory (SKLECRA2013OFP15)]。

作者简介：周利明（1981-），男，河北唐山人，博士，讲师，主要从事植物细胞信号传导研究，（E-mail）zhouliming363@163.com。

*__通讯作者：__房玮，博士，讲师，主要从事植物细胞信号传导研究，（E-mail）465811609@qq.com。

entire growth process requires multiple signaling systems to regulate plant cell growth and orientation. Calcium, as a second messenger, is achieved by calcium sensors CBLs, and then activates downstream target CIPKs to participate in the regulation of cell polarity development. In this study, CIPK9 was identified as a candidate gene, and subsequently the PCR-amplified coding region of CIPK9 was cloned into pLAT52-GFP vector for transient expression in pollen tubes. The C-terminus of CIPK9 was fused to green fluorescent protein (GFP), and the resulting constructs were transiently expressed in tobacco pollen grains by gene-gun transform technology. CIPK9-GFP subcellular localization and biological function in pollen tube were studied by transient expression system (particle bombardment). GFP-labeled CIPK9 was localized in granular organelles with high-speed movement in pollen tubes, and shifted regularly with the cytoplasmic circulation. In order to further study the biological function of CIPK9, a constitutively active CIPK9 (CACIPK9) was constructed. Compared with full-length CIPK9, CACIPK9 lacks the regulatory region at the C-terminal and has a Thr-178-to-Asp point mutation in the activation loop containing conserved Asp-Phe-Gly and Ala-Pro-Glu motifs. CACIPK9 thus has sustained high kinase activity without regulation. While CACIPK9 lacking C-terminal regulatory region was evenly distributed in the pollen tube cytoplasm, similar to that of GFP control, suggesting that the C-terminal of CIPK9 plays an important role in the correct subcellular localization of CIPK9 in pollen tube. In addition, overexpression of CACIPK9 could induce the depolarization of pollen tube growth. In conclusion, CIPK9, as a member of the downstream family of calcium signaling, participates in the process of pollen tube polarity growth and plays a role in pollen tube growth.

Key words: pollen tube, calcium ion, CBL-interactive protein kinase, polarized growth, signaling pathway

植物花粉萌发及生长是一个复杂的动力学过程：散落到柱头上的花粉经过相互识别之后，从萌发孔生长出花粉管，穿过花柱组织到达子房，最终将携带的精细胞释放到胚囊中完成受精过程。整个过程发生在雌雄配子之间，涉及多条信号调控途径，包括钙信号、小 G 蛋白、活性氧（ROS）和磷脂等（Kolukisaoglu et al., 2004）。

细胞的生长模式主要分为弥散生长（diffuse growth）与顶端生长（tip growth）两种类型。弥散生长是整个细胞的均匀膨胀过程（缺少方向性），而顶端生长则主要集中在细胞的某一特定区域（花粉管顶端）。因此花粉管作为一类典型的顶端生长模式系统，被广泛用于研究植物细胞的极性发育（Yang, 2002; Fu et al., 2001）。花粉管的顶端生长有赖于细胞骨架的动态排布、囊泡的极性运输和胞吐作用等多方面，以此决定萌发起始的位点及极性生长的方向。目前已知多个信号分子如钙离子、小 G 蛋白、活性氧（ROS）和磷脂等在花粉管顶端生长过程中发挥重要作用（Rounds & Bezanilla, 2013）。其中钙信号可被某类钙传感器识别，并引起一系列的下游级联反应（Kroeger & Geitmann, 2012; Rounds & Bezanilla, 2013）。类钙调神经磷酸酶 B 亚基（calcineurin B-like protein, CBL）作为一类典型的钙传感器家族，协同其下游互作蛋白激酶（CBL interacting protein kinase, CIPK），可以形成错综复杂的 CBL-CIPK 介导的钙信号网络（Luan, 2009; Hepler et al., 2011）。目前 CBL-CIPK 相关研究主要集中在植物胁迫响应机制方面，例如在盐胁迫下，CBL4-CIPK24 复合物调节质膜上的 Na^+/K^+逆向转运体 SOS1 以排除钠离子，而 CBL10-CIPK24 复合物可能参与液泡中钠离子的固定作用（Liu et al., 2000; Kim et al., 2007; Quan et al., 2007）。对于低钾胁迫，CBL1 和 CBL9 与 CIPK23 相互作用，进而调节一个钾离子通道（Arabidopsis K^+ transporter 1, AKT1），以介导

根毛中钾离子的摄取（Xu et al., 2006）。

近些年来，CBL-CIPK 复合物在非生物胁迫（寒冷、干旱和盐害）耐受中的作用已被广泛研究，但对 CBL-CIPK 在花粉管极性生长中的作用研究却十分有限。本文主要研究钙信号下游家族中的 CIPK9 参与的花粉管极性生长过程。全长 CIPK9 及其持续激活型与绿色荧光蛋白（GFP）相融合，通过基因枪技术在烟草花粉中进行瞬时表达，观察其亚细胞定位及其在花粉管中诱导的表型，从而探究 CIPK9 在极性生长过程中发挥的作用。研究成果对深入揭示花粉管生长过程中的相关信号调控网络具有一定的理论指导意义。

1. 材料和方法

1.1 植物材料及生长条件

目前用作研究的植物材料：拟南芥（*Arabidopsis thaliana* L.，Col-0）培育在 22 ℃的温室中，光照 16 h，黑暗 8 h。烟草（*Nicotiana tabacum* L）培育在 28 ℃温室中，光周期为 12 h/12 h。

1.2 瞬时表达载体构建

CIPK9 全长 cDNA（序列号为 U15436）购自 ABRC（Arabidopsis Biological Resource Center），然后设计引物序列用于 PCR 扩增 CIPK9 基因片段。上游引物（TCTAGAATGAGTGGAAGCAGAAGGA）携带 Xba I 酶切位点，下游引物（GGATCCCTTGCTTTTGTTCTTCA）携带 BamH I 酶切位点，扩增所得 CIPK9 基因片段接入 T 载体（Promega 公司），转化大肠杆菌 DH5α，选定阳性克隆并进行质粒提取，随后进行酶切鉴定及序列测序，序列检测正确的目的片段被接入 pLAT52:GFP 载体中（Wu et al., 2001）。对于 CACIPK9 的构建，CIPK9 的 C 端调控区域（316-451 位氨基酸）被切除，随后将保守 DFG-APE 模体（位于激酶结构域中的激活环，activation loop）中的 178 位的苏氨酸（THR）突变为天冬氨酸（ASP）（Guo et al., 2001; Albrecht et al., 2001），最后测序正确的目的片段被接入 pLAT52:GFP 载体中。

1.3 基因枪瞬时表达实验

收集新鲜的烟草花粉（8 朵花的花粉/每批瞬时转化）备用，通过 Plasmid Mini Kits 试剂盒（QIAGEN, Germany）提取目的质粒 DNA，随后紫外分光光度计测定具体浓度。按照以往的瞬时表达烟草花粉的实验步骤(Fu et al., 2001)，每组转化实验使用0.8 μg的质粒DNA，转化后的烟草花粉粒在 28 ℃中，避光培养 3-4 小时，然后利用荧光显微镜或者共聚焦扫描显微镜进行表型及亚细胞定位观察。

1.4 花粉管表型分析

通过荧光倒置显微镜（BX51；OLYMPUS）观察转化成功的花粉管，并以 CCD 摄像机（DP70 型；OLYMPUS）拍摄相应照片。使用 Zeiss LSM 图像浏览器（3.2 版）中的测量功能分析所获得的照片，分别测量花粉管的长度及花粉管顶端最宽处的直径。每种基因型分别进行 3 次独立的转化实验，一共收集 80 根左右的花粉管长度与宽度，以此作为判定花粉管是否具备去极化生长的表型特征。

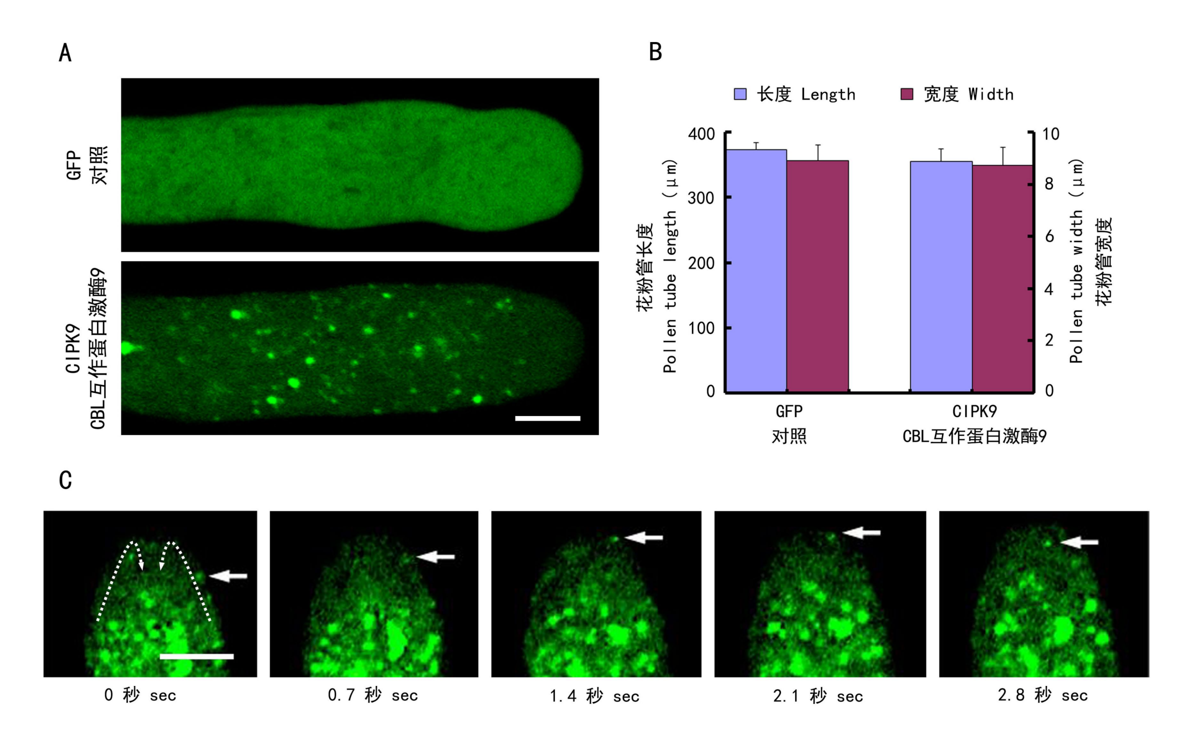
1.5 亚细胞定位观察

利用共焦激光扫描显微镜（Model LSM 510 META; Zeiss, Germany）观察 GFP 标签化的 CIPK9（或 CACIPK9）在花粉管中的亚细胞定位情况（激发光为 488 nm，发射光为 505-530 nm），使用 Zeiss LSM 图像浏览器（3.2 版）进行相应的图像分析。

2. 结果与分析

2.1 CIPK9 的亚细胞定位及过表达表型

类钙调神经磷酸酶 B 亚基（CBL）属于植物所特有的一类钙离子感受器，其下游存在一组互作的蛋白激酶（CBL-interactive protein kinase, CIPK）（Luan et al., 2002; Shi et al., 1999）。我们挑选 CIPK9 作为候选基因，将其与绿色荧光蛋白（GFP）相融合，在花粉特异启动子 LAT52 的驱动下，利用基因枪技术在烟草花粉中进行瞬时表达，最终通过显微镜观察对应的表型及亚细胞定位。实验结果显示过量表达 CIPK9 并没有使花粉管极性生长发生显著的表型变化（图 1：B）。亚细胞定位结果显示 GFP 单独表达（对照实验）在花粉管中呈现弥散分布，而 CIPK9-GFP 则定位于花粉管中的颗粒状细胞器上（图 1：A），这些颗粒状细胞器可随胞质环流进行“反式喷泉式”的规律运动，即沿着花粉管两侧运动到质膜顶端，然后从花粉管中轴返回到基端（图 1：C）。



注：**A.** 瞬时表达 CIPK9-GFP 的花粉管亚细胞定位图。单独表达 GFP 的花粉管亚细胞定位被用作对照（在图中表示为 GFP），标尺为 5 μm；**B.** CIPK9-GFP 过表达造成的花粉管表型的量化分析。柱状图数值=平均值±标准差，误差线表示标准差；**C.** CIPK9-GFP 所标记的亚细胞结构（箭头所指）的动态定位分析。

每隔 0.7 秒采集一次图片，标尺为 5 μm。

Note: **A.** Representative confocal images of pollen tubes transiently expressing CIPK9-GFP. Tube expressing GFP alone was used as a control (GFP). Bar = 5 μm; **B.** Quantitative analysis of pollen tube phenotypes induced by

overexpression of CIPK9-GFP. Error bars indicate standard deviation; **C.** A series of time-lapse images track a CIPK9-GFP-tagged granule (arrow) moving to the apical PM. Images are collected every 0.7 sec. Bar = 5 μm.

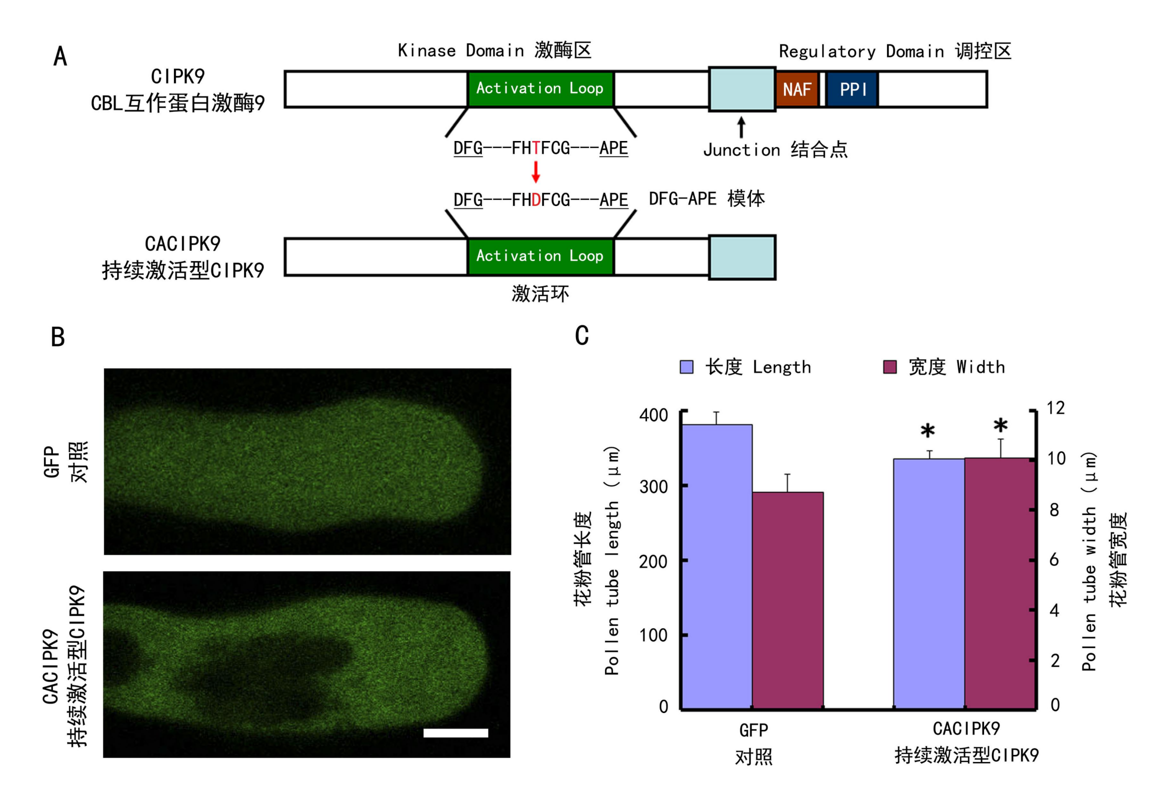
图 1 CIPK9 在花粉管中的过表达表型与亚细胞定位

Fig.1 Subcellular localization and overexpression phenotype for CIPK9 in tobacco pollen tubes

2.2 持续激活型 CIPK9（CACIPK9）引起表型及定位异常

为了进一步研究 CIPK9 在花粉管生长中的功能，我们构建了 CIPK9 的持续激活形式（constitutively active, CA）。如图 2：A 所示，全长 CIPK9 包含 2 个重要的结构域，一个是激酶结构域（kinase domain），另一个是调控结构域（regulatory domain）。CIPK9 的调控结构域位于序列的 C 末端，包含一个高度保守的 NAF 模体（NAF motif），由 21 个氨基酸组成，是一段与 CBLs 互作的区域（Kim et al., 2000）。除此之外，NAF 模体可通过结合 CIPKs 的激酶结构域，对其激酶活性进行自抑制作用（Kolukisaoglu et al., 2004）。NAF 模体旁边是一段 PPI 模体（protein phosphatase interaction motif），CIPKs 与蛋白磷酸酶 2C 之间的相互作用可能通过这一结构区域得以实现（Ohta et al., 2003）。CACIPK9 主要保留了激酶结构域，而去除了自身的调控结构域（包含自抑制区）。另外对激酶结构域中的激活环（activation loop）进行点突变（将 178 位的苏氨酸突变为天冬氨酸），进一步提高 CIPK9 的激酶活性。

构建成功的 CACIPK9 片段采取与全长 CIPK9 相似的策略，通过基因枪在烟草花粉中进行瞬时表达，进而研究 CACIPK9-GFP 的表型与定位。结果显示 CACIPK9 的瞬时表达可以引起花粉管的去极化生长，即花粉管长度有所缩短（从对照的 381.67 μm 减少到 335.41 μm），而花粉管的宽度有所增加（从对照的 8.74 μm 增加到 10.11 μm）。对于亚细胞定位研究，与 CIPK9-GFP 的颗粒状细胞器定位不同，CACIPK9-GFP 表现出非特异性的亚细胞定位，即与 GFP 对照相同的花粉管中弥散定位。这一结构暗示 CIPK9 的正常定位与其结构的完整性密切相关。



注： A. 持续激活型 CIPK9（CACIPK9）的构建图解；B. 瞬时表达 CACIPK9-GFP 的花粉管亚细胞定位图。单独表达 GFP 的花粉管亚细胞定位被用作对照（在图中表示为 GFP），标尺为 5 μm；C. CACIPK9-GFP 过表达造成的花粉管表型的量化分析。星号代表与 GFP 单独表达的对照组存在显著性差异（P<0.01，T 检验）。柱状图数值=平均值±标准差，误差线表示标准差。

Note: A. Diagram of the C-terminal truncation and mutation for CIPK9 used in transient expression; B. Representative confocal images of pollen tubes transiently expressing CACIPK9-GFP. Tube expressing GFP alone was used as a control (GFP). Bar=5 μm; C. Quantitative analysis of pollen tube phenotypes induced by overexpression of CACIPK9-GFP. Asterisks represent significant differences from the GFP control (P<0.01, Student's t test). Error bars indicate standard deviation.

图 2 CACIPK9 在花粉管中的过表达表型与亚细胞定位

Fig.2 Subcellular localization and overexpression phenotype for CACIPK9 in tobacco pollen tubes

3. 结论与讨论

细胞极性是细胞发育的基本属性之一，主要体现为细胞结构与组成成分的不对称性（Yang, 2008）。植物细胞极性的确立与维持涉及多种信号调控因子，例如钙离子、胞吞与胞吞及细胞骨架等，各信号因子需要维持在特定水平，已形成稳定的花粉管顶端生长（Kroeger & Geitmann, 2012）。

钙离子浓度对于调控花粉管的生长和导向，起着至关重要的作用。拟南芥基因组中包含 4 个主要的钙离子感受器家族，分别为钙调素（CaM）、类钙调素（CML）、类钙调神经磷酸酶 B 亚基（CBL）以及钙依赖蛋白激酶（CPK）（McCormack et al., 2005）。其中 CBL 是一

类植物中特有的基因家族，在结构上与动物中的神经磷酸酶的 B 亚基类似。CBL 的下游效应子是一类 Ser/Thr 的蛋白激酶（CIPK），CBL-CIPK 体系共同作用，感知并传递钙信号的变化（Luan et al., 2002)。本文中 CIPK9-GFP 定位于随胞质环流运动的颗粒状细胞器上，从运动方式上推测该结构可能是花粉管内膜系统的囊泡（图 1：A），实验结果暗示 CIPK9 可能通过调控花粉管中的囊泡系统影响细胞的极性生长。CIPK9 的 C 末端含有一段自抑制区域（NAF motif），同时也是一段与其上游效应子（CBLs）结合的区域（图 2：A）。CBLs 结合到相应 CIPKs 上，解除其自抑制作用，从而激活 CIPK 的激酶活性(Luan et al., 2002; Kim et al., 2000）。本文中构建的持续激活型 CIPK9（CACIPK9）体现了相同的效果，并在此基础之上，通过突变激酶区域的保守结构进一步激活了 CIPK9 的激酶活性。实验结果显示 CACIPK9 在烟草花粉中的瞬时表达抑制了花粉管的纵向生长，促进了花粉管的横向生长，最终造成了细胞的去极化生长表型（图 2：B，C）。另外，由于 C 端的缺失造成了 CACIPK9-GFP 的亚细胞定位呈现出非特异性的弥散定位（图 2：B），说明 CIPK9 的 C 端调控结构域是其在花粉管中正确定位的关键因素，同时亚细胞定位的异常也可以影响 CIPK9 在花粉管极性生长中功能的正常发挥。

前人关于 CBL-CIPK 网络的研究主要集中于胁迫信号途径（Quan et al., 2007; Cheong et al., 2007; Xu et al., 2006），本文的研究为 CIPK9 在花粉管极性生长的作用做出了新的介绍，为 CIPK9 的生物学功能提供了新的认识，但 CIPK9 在花粉管中定位细胞器的具体性质（是否囊泡体系）和调控花粉管极性生长的具体作用机理，还有待于进一步的研究和探索。未来 CIPK9 下游靶蛋白的确定及其作用机制的阐明将进一步揭示 CIPK 信号网络在花粉管极性生长中所发挥的重要作用。

参考文献：

ALBRECHT V, RITZ O, LINDER S, et al., 2001. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca^{2+}-regulated kinases [J]. EMBO J, 20(5): 1051-1063.

CHEONG YH, PANDEY GK, GRANT JJ, et al. 2007. Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 52(2): 223-239.

FU Y, WU G, YANG Z, 2001. Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes [J]. J Cell Biol, 152(5): 1019-1032.

GUO Y, HALFTER U, ISHITANI M, et al., 2001. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance [J]. Plant Cell, 13(6): 1383-1400.

HEPLER PK, KUNKEL JG, ROUNDS CM, et al., 2011. Calcium entry into pollen tubes [J]. Trends Plant Sci, 17(1): 32-38.

KIM BG, WAADT R, CHEONG YH, et al., 2007, The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 52(3): 473-484

KIM KN, CHEONG YH, GUPTA R, et al., 2000. Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases [J]. Plant Physiol, 124(4): 1844-1853.

KOLUKISAOGLU U, WEINL S, BLAZEVIC D, et al., 2004. Calcium sensors and their

interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks [J]. Plant Physiol, 134(1): 43-58.

KROEGER J, GEITMANN A, 2012. The pollen tube paradigm revisited [J]. Curr Opin Plant Biol, 15(6): 618-624.

LIU J, ISHITANI M, HALFTER U, et al., 2000, The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance [J]. PNAS, 97(7): 3730-3734

LUAN S, KUDLA J, RODRIGUEZ-CONCEPCION M, et al., 2002. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants [J]. Plant Cell, 14 Suppl: S389-400.

LUAN S, 2009. The CBL-CIPK network in plant calcium signaling [J]. Trends Plant Sci, 14(1): 37-42

MCCORMACK E, TSAI YC, BRAAM J, 2005. Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs [J]. Trends Plant Sci, 10(8): 383-389.

OHTA M, GUO Y, HALFTER U, et al., 2003. A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2 [J]. PNAS, 100(20): 11771-11776.

QUAN R, LIN H, MENDOZA I, et al., 2007. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress [J]. Plant Cell, 19(4): 1415-1431.

ROUNDS CM, BEZANILLA M, 2013. Growth mechanisms in tip-growing plant cells [J]. Annu Rev Plant Biol, 64: 243-265.

SHI J, KIM KN, RITZ O, et al., 1999. Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 11(12): 2393-2405.

WU G, GU Y, LI S, et al., 2001. A genome-wide analysis of *Arabidopsis* Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets [J]. Plant Cell, 13(12): 2841-2856.

XU J, LI HD, CHEN LQ, et al., 2006. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^+ transporter AKT1 in *Arabidopsis* [J]. Cell, 125(7): 1347-1360.

YANG Z, 2002. Small GTPases versatile signaling switches in plants [J]. Plant Cell, 14(Suppl 1): S375-S388.

YANG Z, 2008. Cell polarity signaling in *Arabidopsis* [J]. Ann Rev Cell Dev Biol, 24: 551-575.